

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

JUNGBLUT, Bernhard  
Gelfertstrasse 56  
D-14195 Berlin  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 14 June 2000 (14.06.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference UNJ/PCT/0001	
International application No. PCT/DE00/00330	International filing date (day/month/year) 28 January 2000 (28.01.00)

1. The following indications appeared on record concerning:	
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address NOWAK, Götz Ziegesaustrasse 1 D-07747 Jena Germany	State of Nationality DE
	State of Residence DE
	Telephone No.
	Facsimile No.
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:	
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input checked="" type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address HAEMOSYS GMBH Drackendorfer Strasse 1 D-07747 Jena Germany	State of Nationality DE
	State of Residence DE
	Telephone No.
	Facsimile No.
3. Further observations, if necessary: <b>Assignment from applicant NOWAK to new applicant HAEMOSYS GMBH of rights for all designated States except the US. Mr. NOWAK is now recorded as applicant/inventor for the US only.</b>	
4. A copy of this notification has been sent to:	
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Ellen Moyse
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)	
International application No. PCT/DE00/00330	Applicant's or agent's file reference UNJ/PCT/0001
International filing date (day/month/year) 28 January 2000 (28.01.00)	Priority date (day/month/year) 04 February 1999 (04.02.99)
Applicant NOWAK, Götz et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

01 September 2000 (01.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Antonia Muller Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>UNJ/PCT/0001</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 00/ 00330</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>28/01/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>04/02/1999</b>
Anmelder  <b>NOWAK, Götz et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 6 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

- ☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☒ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☒ keine der Abb.
- ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 13

Anspruch 13 bezieht sich auf Produkte, charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich die Eigenschaft Thrombin zu hemmen.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen würden, wohingegen die Patentanmeldung durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für solcher Produkte gestützt wird die im Stand der Technik bekannt sind. Anspruch 13 fehlt damit den Gegenstand anzugeben für den Schutz begehrt wird. Im vorliegenden Fall sind die Patentansprüche nicht gestützt und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche für die beanspruchte Produkte über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend Verfahren und Testkits (Ansprüche 1-12).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Feld III

WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

The page of the abstract as originally filed:

line 8 : after "Körperflüssigkeit." the text is erased till line 12  
"Körperflüssigkeit"

line 18 : after "Prothrombin." the text is erased till line 22 end.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12Q1/56

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X ✓	HAN JIN-HUA ET AL: "Inhibition of meizothrombin and meizothrombin(desF1) by heparin cofactor II." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 45, 7. November 1997 (1997-11-07), Seiten 28660-28665, XP002141790 ISSN: 0021-9258 Seite 28661, linke Spalte, Zeile 14 - Zeile 30  --- -/--	1-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoekstra, S

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>✓ DOYLE M F ET AL: "MULTIPLE ACTIVE FORMS OF THROMBIN IV. RELATIVE ACTIVITIES OF MEIZOTHROMBINS"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 265, Nr. 18, 1990, Seiten 10693-10701, XP002141791 ISSN: 0021-9258 Seite 10695, rechte Spalte Zusammenfassung</p>	1-12
Y	<p>✓ US 5 547 850 A (NOWAK GOETZ ET AL) 20. August 1996 (1996-08-20) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument Ansprüche</p>	1-12
Y	<p>✓ US 5 529 905 A (LANG HARTMUT ET AL) 25. Juni 1996 (1996-06-25) Spalte 2, Zeile 14 - Zeile 17 Spalte 2, Zeile 51 - Zeile 52 Spalte 3, Zeile 24 - Zeile 28</p>	1-12
A	<p>✓ EP 0 570 355 A (IMMUNO AG) 18. November 1993 (1993-11-18) das ganze Dokument</p>	1-12

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/00330

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5547850	A	20-08-1996	DE 4203980 A	12-08-1993
			AT 136367 T	15-04-1996
			DE 59302119 D	09-05-1996
			DK 626070 T	06-05-1996
			WO 9316390 A	19-08-1993
			EP 0626070 A	30-11-1994
			ES 2087715 T	16-07-1996
			JP 7503373 T	13-04-1995
US 5529905	A	25-06-1996	AT 397391 B	25-03-1994
			AT 100092 A	15-08-1993
			AT 175243 T	15-01-1999
			CA 2096076 A	16-11-1993
			CZ 9300880 A	15-12-1993
			DE 59309254 D	11-02-1999
			EP 0570355 A	18-11-1993
			ES 2126641 T	01-04-1999
			FI 932194 A	16-11-1993
			HU 64698 A	28-02-1994
			JP 6030793 A	08-02-1994
			MX 9302830 A	31-05-1994
			NO 931772 A	16-11-1993
			SK 48893 A	08-12-1993
EP 0570355	A	18-11-1993	AT 397391 B	25-03-1994
			AT 100092 A	15-08-1993
			AT 175243 T	15-01-1999
			CA 2096076 A	16-11-1993
			CZ 9300880 A	15-12-1993
			DE 59309254 D	11-02-1999
			ES 2126641 T	01-04-1999
			FI 932194 A	16-11-1993
			HU 64698 A	28-02-1994
			JP 6030793 A	08-02-1994
			MX 9302830 A	31-05-1994
			NO 931772 A	16-11-1993
			SK 48893 A	08-12-1993
			US 5529905 A	25-06-1996

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Translation  
09/890654

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED  
FEB 14 2002  
TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference UNJ/PCT/0001	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/00330	International filing date (day/month/year) 28 January 2000 (28.01.00)	Priority date (day/month/year) 04 February 1999 (04.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/56		
Applicant HAEMOSYS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 September 2000 (01.09.00)	Date of completion of this report 23 February 2001 (23.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/00330

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-13, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 1-13, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
pages 1/1, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/00330

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 13

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 13

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box III.

Claim 13 refers to products which are characterised by a desirable characteristic or property, namely the property of inhibiting thrombin. The claims therefore cover all products etc. that would have this characteristic or property, whereas the application is supported by the description (under PCT Article 5) only for such products that are known from the prior art. Claim 13 therefore fails to indicate the subject matter for which protection is sought. In the present case the claims are not supported and the application lacks the necessary disclosure to such an extent that it does not appear to be possible to carry out a meaningful examination under PCT Rule 66.2(a)(ii) of the claimed products over the full desired range of protection. Notwithstanding, the claims also lack the clarity required by PCT Article 6, since they attempt to define the product in terms of the desired result. This lack of clarity is also such that it does not appear to be possible to carry out a meaningful examination over the full desired range of protection.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

The present application concerns a method for the fibrin-independent determination of thrombin inhibitors in which coagulation is avoided and a chromogenic or fluorogenic meizothrombin or meizothrombin-des-fragment 1 substrate is split. The meizothrombin or meizothrombin-des-fragment 1 is added or formed *in vitro* by the addition of ecarin or similar snake venoms.

Jin-Hua Han, The Journal of Biochemistry, 1997, Vol. 272(45), pages 28660-28665 (D1) discloses, on page 28661, second paragraph, a method for determining the inhibition of meizothrombin or meizothrombin-des-fragment 1. All the features of the present Claims 1-12 are present in this method. Consequently, the present application does not meet the requirements of PCT Article 33(2).

The description assumes that the knowledge that chromogenic or fluorogenic substrates that are specifically split by thrombin are also split by thrombin fragments such as meizothrombin or meizothrombin-des-fragment 1, is novel. However, this knowledge is already made public in D1 and also

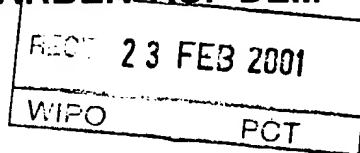
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

in Doyle et al., The Journal of Biochemistry, 1990, Vol. 265(18), pages 10693-10701 (D2), US-A-5 529 905 and EP-A-0 570 355. If the applicant were to add any features to the present method in order to establish novelty, then such a method would be considered obvious in view of the combined teaching of US-A-5 547 850 and D1.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT



### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts UNJ/PCT/0001	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00330	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 28/01/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 04/02/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/56		
Anmelder NOWAK, Götz et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  01/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  23.02.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Hoekstra, S  Tel. Nr. +31 70 340 2847 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-13                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-13                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/1                        ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.  
☒ Ansprüche Nr. 13.

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 13 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-12
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-12
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-12
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen  
siehe Beiblatt**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Zu Punkt III**

**Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Anspruch 13 bezieht sich auf Produkte, charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich die Eigenschaft Thrombin zu hemmen. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen würden, wohingegen die Patentanmeldung durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für solcher Produkte gestützt wird die im Stand der Technik bekannt sind. Anspruch 13 fehlt damit den Gegenstand anzugeben für den Schutz begehrt wird. Im vorliegenden Fall sind die Patentansprüche nicht gestützt und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Prüfung nach Regel 66.2(a)(ii) für die beanspruchte Produkte über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Prüfung über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

Die vorliegende Anmeldung betrifft Verfahren zur fibrin-unabhängige Bestimmung von Thrombininhibitoren wobei gerinnung vermieden wird und wobei ein chromogenes oder fluorogenes Substrat von Meizothrombin oder Meizothrombin des-fragment1 gespalten wird. Das Meizothrombin oder Meizothrombin des-fragment1 wird zugegeben oder in vitro gebildet durch Zusetzung van ecarin oder ähnliche slangegifte.

Jin-Hua Han, The journal of Biochemistry, 1997, vol.272(45), pp. 28660-28665 (D1) Offenbart auf Seite 28661, zweiter Absatz, ein Verfahren um hemmung von Meizothrombin oder Meizothrombin des-fragment1 zu Bestimmen. Alle Merkmale der vorliegende Ansprüche 1-12 sind in diesem Verfahren anwesend. Die vorliegende

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Anmeldung erfüllt daher nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT.

Die Beschreibung geht davon aus dass die Wissenschaft, dass chromogene oder fluorogene Substrate, die spezifisch von Thrombin gespalten werden, auch von Thrombinfragmente wie meizothrombin oder Meizothrombin des-fragment1 gespalten werden, neu ist. Aus D1 , aber auch aus Doyle et al., The journal of Biochemistry, 1990, vol.265(18), pp. 10693-10701 (D2), US5529905, oder EP570355 ist diese Wissenschaft schon zu entnehmen. Würde der Anmelder, um neuheit zu herstellen, das vorliegende Verfahren irgendwelche Merkmale hinzufügen, dann wird ein solches Verfahren, im Hinblick auf die Kombinierte Lehre von US5547850 und D1, als naheliegend angesehen werden.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b>  <b>C12Q 1/56</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46602</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 10. August 2000 (10.08.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE00/00330  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 28. Januar 2000 (28.01.00)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 04 674.3                      4. Februar 1999 (04.02.99)                      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> HAEMOSYS GMBH [DE/DE]; Drackendorfer Strasse 1, D-07747 Jena (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> NOWAK, Götz [DE/DE]; Ziegesaustrasse 1, D-07747 Jena (DE). BUCHA, Elke [DE/DE]; Kirchberg 9, D-99094 Erfurt (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> JUNGBLUT, Bernhard usw.; Gelfertstrasse 56, D-14195 Berlin (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 16. November 2000 (16.11.00)	

**(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE CONCENTRATION OF THROMBIN INHIBITORS**

**(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON THROMBININHIBITOREN**

**(57) Abstract**

The invention relates to a method for determining the concentration of thrombin inhibitors in a non-turbid body fluid or a non-turbid extract from a body fluid. The body fluid is taken from a living organism and is separated, if required, from the turbidities. An anticoagulative agent that does not affect the prothrombin/active meizothrombin or Mtdesfgl conversion process, a chromogenic or fluorogenic substrate that can be cleaved by active meizothrombin or Mtdesfgl and a substance that cleaves prothrombin into meizothrombin or Mtdesfgl, in addition to prothrombin (optionally) are added to the non-turbid body fluid thus obtained. The mixture thus obtained undergoes time-based wavelength-selective light absorption or light emission measurement. The amount of thrombin inhibitor contained in the body fluid is determined by means of comparison with determined standard curves on the basis of a decrease in the absorption or emission of light.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit. Sie weist die folgenden Verfahrensschritte auf: einem Lebewesen wird die Körperflüssigkeit entnommen und die Körperflüssigkeit wird erforderlichenfalls einer Abtrennung von Trübstoffen unterworfen. Der so erhaltenen nicht-trüben Körperflüssigkeit wird ein nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifendes gerinnungshemmendes Mittel, ein durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbares chromogenes oder fluorogenes Substrat und eine Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltende Substanz zugegeben, sowie, optional, Prothrombin. Die so erhaltene Lösung bzw. Mischung wird einer wellenlängenselektiven Lichtabsorptions- oder Lichtemissionsmessung in Abhängigkeit von der Zeit unterworfen. Aus der Abnahme der Lichtabsorption oder Lichtemission je Zeiteinheit wird die in der Körperflüssigkeit enthaltene Menge des Thrombininhibitors durch Vergleich mit ermittelten Standardkurven bestimmt.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00330

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HAN JIN-HUA ET AL: "Inhibition of meizothrombin and meizothrombin(desF1) by heparin cofactor II."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 45, 7 November 1997 (1997-11-07), pages 28660-28665, XP002141790</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>page 28661, left-hand column, line 14 - line 30</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 July 2000

Date of mailing of the international search report

24/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 00/00330

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DOYLE M F ET AL: "MULTIPLE ACTIVE FORMS OF THROMBIN IV. RELATIVE ACTIVITIES OF MEIZOTHROMBINS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 265, no. 18, 1990, pages 10693-10701, XP002141791 ISSN: 0021-9258 page 10695, right-hand column abstract	1-12
Y	US 5 547 850 A (NOWAK GOETZ ET AL) 20 August 1996 (1996-08-20) cited in the application the whole document claims	1-12
Y	US 5 529 905 A (LANG HARTMUT ET AL) 25 June 1996 (1996-06-25) column 2, line 14 - line 17 column 2, line 51 - line 52 column 3, line 24 - line 28	1-12
A	EP 0 570 355 A (IMMUNO AG) 18 November 1993 (1993-11-18) the whole document	1-12

## ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

Continuation of box I.2

## Claim No. 13

Claim 13 refers to products that are characterized by a desirable peculiarity or property i.e. the ability to inhibit thrombin.

The patent claims therefore include all products etc. which exhibit this peculiarity or property, whereas the patent application is only supported by the description according to the terms of Article 5 PCT for products which are known per se in prior art. Claim 13 fails to cite the subject matter for which protection is sought. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. Moreover, the patent claims lack the clarity required in Article 6 PCT, whereby an attempt is made to define the product by the respectively desired result. The lack of clarity is such that it is impossible to carry out a search covering the full scope of protection sought. For this reason, the search was limited to parts of the claims that seemed to be supported and disclosed according to the above-mentioned terms, i.e. parts relating to methods and test kits (Claims Nos. 1-12).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e)PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/00330

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5547850 A	20-08-1996	DE 4203980 A	12-08-1993
		AT 136367 T	15-04-1996
		DE 59302119 D	09-05-1996
		DK 626070 T	06-05-1996
		WO 9316390 A	19-08-1993
		EP 0626070 A	30-11-1994
		ES 2087715 T	16-07-1996
		JP 7503373 T	13-04-1995
US 5529905 A	25-06-1996	AT 397391 B	25-03-1994
		AT 100092 A	15-08-1993
		AT 175243 T	15-01-1999
		CA 2096076 A	16-11-1993
		CZ 9300880 A	15-12-1993
		DE 59309254 D	11-02-1999
		EP 0570355 A	18-11-1993
		ES 2126641 T	01-04-1999
		FI 932194 A	16-11-1993
		HU 64698 A	28-02-1994
		JP 6030793 A	08-02-1994
		MX 9302830 A	31-05-1994
		NO 931772 A	16-11-1993
		SK 48893 A	08-12-1993
EP 0570355 A	18-11-1993	AT 397391 B	25-03-1994
		AT 100092 A	15-08-1993
		AT 175243 T	15-01-1999
		CA 2096076 A	16-11-1993
		CZ 9300880 A	15-12-1993
		DE 59309254 D	11-02-1999
		ES 2126641 T	01-04-1999
		FI 932194 A	16-11-1993
		HU 64698 A	28-02-1994
		JP 6030793 A	08-02-1994
		MX 9302830 A	31-05-1994
		NO 931772 A	16-11-1993
		SK 48893 A	08-12-1993
		US 5529905 A	25-06-1996

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/56

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HAN JIN-HUA ET AL: "Inhibition of meizothrombin and meizothrombin(desF1) by heparin cofactor II." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 272, Nr. 45, 7. November 1997 (1997-11-07), Seiten 28660-28665, XP002141790 ISSN: 0021-9258 Seite 28661, linke Spalte, Zeile 14 - Zeile 30  --- -/--	1-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoekstra, S

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DOYLE M F ET AL: "MULTIPLE ACTIVE FORMS OF THROMBIN IV. RELATIVE ACTIVITIES OF MEIZOTHROMBINS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 265, Nr. 18, 1990, Seiten 10693-10701, XP002141791 ISSN: 0021-9258 Seite 10695, rechte Spalte Zusammenfassung	1-12
Y	US 5 547 850 A (NOWAK GOETZ ET AL) 20. August 1996 (1996-08-20) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument Ansprüche	1-12
Y	US 5 529 905 A (LANG HARTMUT ET AL) 25. Juni 1996 (1996-06-25) Spalte 2, Zeile 14 - Zeile 17 Spalte 2, Zeile 51 - Zeile 52 Spalte 3, Zeile 24 - Zeile 28	1-12
A	EP 0 570 355 A (IMMUNO AG) 18. November 1993 (1993-11-18) das ganze Dokument	1-12



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 13

Anspruch 13 bezieht sich auf Produkte, charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich die Eigenschaft Thrombin zu hemmen.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen würden, wohingegen die Patentanmeldung durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für solcher Produkte gestützt wird die im Stand der Technik bekannt sind. Anspruch 13 fehlt damit den Gegenstand anzugeben für den Schutz begehrt wird. Im vorliegenden Fall sind die Patentansprüche nicht gestützt und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche für die beanspruchte Produkte über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend Verfahren und Testkits (Ansprüche 1-12).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00330

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5547850 A	20-08-1996	DE 4203980 A	12-08-1993
		AT 136367 T	15-04-1996
		DE 59302119 D	09-05-1996
		DK 626070 T	06-05-1996
		WO 9316390 A	19-08-1993
		EP 0626070 A	30-11-1994
		ES 2087715 T	16-07-1996
		JP 7503373 T	13-04-1995
US 5529905 A	25-06-1996	AT 397391 B	25-03-1994
		AT 100092 A	15-08-1993
		AT 175243 T	15-01-1999
		CA 2096076 A	16-11-1993
		CZ 9300880 A	15-12-1993
		DE 59309254 D	11-02-1999
		EP 0570355 A	18-11-1993
		ES 2126641 T	01-04-1999
		FI 932194 A	16-11-1993
		HU 64698 A	28-02-1994
		JP 6030793 A	08-02-1994
		MX 9302830 A	31-05-1994
		NO 931772 A	16-11-1993
		SK 48893 A	08-12-1993
EP 0570355 A	18-11-1993	AT 397391 B	25-03-1994
		AT 100092 A	15-08-1993
		AT 175243 T	15-01-1999
		CA 2096076 A	16-11-1993
		CZ 9300880 A	15-12-1993
		DE 59309254 D	11-02-1999
		ES 2126641 T	01-04-1999
		FI 932194 A	16-11-1993
		HU 64698 A	28-02-1994
		JP 6030793 A	08-02-1994
		MX 9302830 A	31-05-1994
		NO 931772 A	16-11-1993
		SK 48893 A	08-12-1993
		US 5529905 A	25-06-1996

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>G01N 33/86</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46602</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE00/00330 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 28. Januar 2000 (28.01.00)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 04 674.3      4. Februar 1999 (04.02.99)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> HAEMOSYS GMBH [DE/DE]; Drackendorfer Strasse 1, D-07747 Jena (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> NOWAK, Götz [DE/DE]; Ziegesaustasse 1, D-07747 Jena (DE). BUCHA, Elke [DE/DE]; Kirchberg 9, D-99094 Erfurt (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> JUNGBLUT, Bernhard usw.; Gelfertstrasse 56, D-14195 Berlin (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE CONCENTRATION OF THROMBIN INHIBITORS</b> <b>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON THROMBININHIBITOREN</b> <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a method for determining the concentration of thrombin inhibitors in a non-turbid body fluid or a non-turbid extract from a body fluid. The body fluid is taken from a living organism and is separated, if required, from the turbidities. An anticoagulative agent that does not affect the prothrombin/active meizothrombin or Mtdesfgl conversion process, a chromogenic or fluorogenic substrate that can be cleaved by active meizothrombin or Mtdesfgl and a substance that cleaves prothrombin into meizothrombin or Mtdesfgl, in addition to prothrombin (optionally) are added to the non-turbid body fluid thus obtained. The mixture thus obtained undergoes time-based wavelength-selective light absorption or light emission measurement. The amount of thrombin inhibitor contained in the body fluid is determined by means of comparison with determined standard curves on the basis of a decrease in the absorption or emission of light.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit. Sie weist die folgenden Verfahrensschritte auf: einem Lebewesen wird die Körperflüssigkeit entnommen und die Körperflüssigkeit wird erforderlichenfalls einer Abtrennung von Trübstoffen unterworfen. Der so erhaltenen nicht-trüben Körperflüssigkeit wird ein nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifendes gerinnungshemmendes Mittel, ein durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbares chromogenes oder fluorogenes Substrat und eine Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltende Substanz zugegeben, sowie, optional, Prothrombin. Die so erhaltene Lösung bzw. Mischung wird einer wellenlängenselektiven Lichtabsorptions- oder Lichtemissionsmessung in Abhängigkeit von der Zeit unterworfen. Aus der Abnahme der Lichtabsorption oder Lichtemission je Zeiteinheit wird die in der Körperflüssigkeit enthaltene Menge des Thrombininhibitors durch Vergleich mit ermittelten Standardkurven bestimmt.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren

### 5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren, wobei einem Lebewesen Körperflüssigkeit entnommen wird und wobei  
10 der Körperflüssigkeit eine Prothrombin in Meizothrombin bzw. Meizothrombin-des Fragment 1 (folgend MTdesfg1)spaltende Substanz zugegeben wird. - Als Thrombininhibitoren werden alle natürlichen oder synthetische Stoffe verstanden, die Thrombin oder Thrombinvorläufer direkt inhibieren. Als Beispiel für einen  
15 natürlichen Thrombininhibitor ist Hirudin zu nennen, welches aus dem Speichel von *Hirudo medicinalis* gewonnen werden kann. Hirudin ist ein sehr kleines Protein bestehend aus 65 Aminosäuren und mit einem Molekulargewicht von 7 kD. Beispiele für synthetische Thrombininhibitoren sind die sogenannten Hirologe, welche dem Hirudin analoge bzw. homologe Teilsequenzen aufweisen, sowie Polypeptide bestehend aus oder mit einem Tripeptid Phe-Pro-Arg oder Derivaten eines solchen Tripeptids,  
20 tids, wie beispielsweise Borsäurederivate, Chloromethylketonderivate, Benzamidinderivate, Arginine, aminosäuremodifizierte Derivate und dergleichen. Den vorstehenden Substanzen ist höchstwahrscheinlich der im wesentlichen gleiche Wirkmechanismus wie bei  
30 Hirudin gemeinsam. Als Spenderlebewesen für die Körperflüssigkeit kommen Menschen und Säugetiere, wie beispielsweise Rodenten, in Frage. Beispiele für Körperflüssigkeiten sind insbesondere Blut bzw. aus Blut

hergestelltes Blutplasma. Aber auch Körperflüssigkeiten, welche kein Prothrombin enthalten, kommen in Frage, wie z.B. Urin, Liquor, Speichel, Peritonealflüssigkeit u.a. Dann wird im Rahmen der Erfindung Prothrombin zugesetzt. Nicht-trüb meint, daß keine beachtlichen Mengen an Schwebstoffen in der zu untersuchenden Körperflüssigkeit vorliegen sollen. Dies kann erforderlichenfalls beispielsweise durch Zentrifugation der Körperflüssigkeit und Abzug des Überstandes erreicht werden.

Der der Erfindung zugrundeliegende theoretische Hintergrund ist der folgende. Die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin ist ein wesentlicher Faktor in der Blutgerinnung. Thrombin wirkt auf die Bildung von Fibrinmonomeren aus Fibrinogen sowie auf die Polymerisation der Fibrinmonomere. Prothrombin wird in Thrombin umgewandelt unter Mitwirkung von aktiviertem Faktor X, aktiviertem Faktor V  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen und Phospholipiden, wie z.B. Plättchenfaktor 3. Hierbei findet eine mehrstufige Reaktion statt, wobei Intermediate in vergleichbar geringer Menge gebildet werden. Wenn jedoch die Koagulation mittels beispielsweise Ecarin oder einem anderen Schlangengift bzw. Schlangengiftfraktion eingeleitet wird, so entsteht demgegenüber ein "atypisches" Intermediat, beispielsweise Meizothrombin, PIVKA Meizothrombin oder Meizothrombin-des Fragment-1 (PIVKA ist die Abkürzung für ein Protein, welches durch einen Vitamin K Antagonisten induziert wird). Diese atypischen Intermediate werden interessanterweise durch beispielsweise Hirudin inaktiviert, nicht jedoch durch Heparin (Inhibitor der Faktoren IIa, IXa, XIa, XIIa und/oder Antithrombin). Sie führen

im übrigen ebenfalls zur Thrombinbildung und subsequent zur Gerinnung. Die Affinität von Hirudin und anderen synthetischen Thrombininhibitoren zu den atypischen Intermediaten ist sehr hoch ( $k_1 > 10^{-10}$  mol/l für Meizothrombin), so daß freies atypisches Intermediat von dem Thrombininhibitor kurzfristig gebunden wird.

Die vorstehenden Zusammenhänge werden in einem Verfahren der eingangs genannten Art, welches beschrieben ist in der Literaturstelle US-A-5,547,850, genutzt, wobei gleichsam der Verbrauch des Thrombininhibitors durch Messung der Verzögerung der Gerinnung erfaßt wird. Eine große Menge an Thrombininhibitor führt zu einer langen Zeit bis zum Gerinnungseintritt und umgekehrt. Dieses Verfahren hat sich in der Praxis grundsätzlich ausgezeichnet bewährt. Als nachteilig hat sich jedoch erwiesen, daß in Fällen verminderten Fibrinogenspiegels Verfälschungen auftreten können, da ein (zu) geringer Fibrinogenspiegel ebenso wie ein hoher Thrombininhibitorspiegel zu langen Gerinnungszeiten führen kann.

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren anzugeben, welches unabhängig vom Fibrinogenspiegel genaue Werte liefert.

Zur Lösung dieses Problems lehrt die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit mit den folgenden Verfahrensschritten: a)

einem Lebewesen wird die Körperflüssigkeit entnommen und die Körperflüssigkeit wird erforderlichenfalls einer Abtrennung von Trübstoffen unterworfen, b) der in Stufe a) erhaltenen nicht-trüben Körperflüssigkeit werden ein nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifendes gerinnungshemmendes Mittel, ein durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbares chromogenes oder flourogenes Substrat und eine Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltende Substanz zugegeben, sowie, optional, Prothrombin, c) die in Stufe b) erhaltene Lösung bzw. Mischung wird einer wellenlängenselektiven Lichtabsorptions- oder Lichtemissionsmessung in Abhängigkeit von der Zeit unterworfen, d) aus der Verminderung der Lichtabsorption oder Lichtemission in Stufe c) je Zeiteinheit wird die in der Körperflüssigkeit enthaltene Menge des Thrombininhibitors durch Vergleich mit ermittelten Standardkurven bestimmt. Alternativ zur Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz oder ergänzend kann Meizothrombin bzw. Mtdesfgl zugegeben sein. Weiterhin lehrt die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der (spezifischen) Aktivität von Thrombininhibitoren (zur Hemmung von generiertem Meizothrombin bzw. MTdesFgl) in einer nicht-trüben wäßrigen Flüssigkeit mit den folgenden Verfahrensschritten: a) einem Lebewesen wird eine Körperflüssigkeit entnommen und die Körperflüssigkeit wird erforderlichenfalls einer Abtrennung von Trübstoffen unterworfen oder eine nicht-trübe Flüssigkeit wird künstlich hergestellt, b) der in Stufe a) erhaltenen nicht-trüben Flüssigkeit werden eine vorgegebene Menge an Thrombininhibitor, ggf. ein nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw.



Mtdefgl eingreifendes gerinnungshemmendes Mittel, ein durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdefgl spaltbares chromogenes oder flourogenes Substrat und eine Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdefgl spaltende  
5 Substanz oder Meizothrombin bzw. Mtdefgl zugegeben, sowie, optional, Prothrombin, c) die in Stufe b) erhaltene Lösung bzw. Mischung wird einer wellenlängenselektiven Lichtabsorptions- oder Lichtemissionsmessung in Abhängigkeit von der Zeit unterworfen,  
10 d) aus der Verminderung der Lichtabsorption oder Lichtemission in Stufe c) je Zeiteinheit wird die Aktivität des Thrombininhibitors durch Vergleich (des Betrages der negativen Steigung) mit ermittelten Standardkurven bestimmt. - Als chromogenes Substrat werden  
15 Substanzen bezeichnet, welche chromophore Gruppen enthalten und spezifisch von Thrombin farbgebend gespalten werden. Flourogene Substrate sind Substanzen, welche spezifisch von Thrombin unter Bildung von fluoreszierenden Substanzen spaltbar sind. Prothrombin  
20 kann zugesetzt werden, wenn die Körperflüssigkeit nicht natürlicherweise ausreichend Prothrombin enthält, wie beispielsweise im Falle von Vitamin K Mangel, oder wenn die zu erwartende Menge an Thrombininhibitor oder Aktivität des Thrombininhibi-  
25 tors dies empfiehlt, oder wenn während einer Krankheit ein Prothrombin-Mangel aufgetreten ist.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, daß chromogene bzw. flourogene Substanzen,  
30 welche spezifisch von Thrombin gespalten werden, ebenso spezifisch von Meizothrombin bzw. Mtdefgl spaltbar sind. Dies ist nicht zu erwarten, da Intermediate zwar notwendige Vorstufen darstellen, jedoch

natürlicherweise nicht dieselbe Wirkungen bzw. Reaktivitäten wie das Thrombin entfalten. Dadurch, daß die erfindungsgemäße Nachweisreaktion allein durch die Überwachung der Meizothrombin bzw. Mtdesfgl-Inhibierung  
5 ung mittels einer Farbreaktion erfolgt, ist der Nachweis völlig unabhängig von dem Fibrinogenspiegel. Vielmehr muß beim Einsatz von Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut bzw. Blutplasma, die Gerinnung sogar unterbunden werden, um die Farbreaktionsauswertung  
10 nicht zu stören. Zudem ist die erfindungsgemäße Thrombininhibitorbestimmung in allen Bereichen mindestens ebenso genau, wie die Bestimmung mittels der vorbekannten Methode bei hohem Fibrinogenspiegel. Auch besteht Unabhängigkeit von eventuell in der Körper-  
15 flüssigkeit enthaltenen, oral verabreichten Antikoagulantien. Weitere Vorteile sind: schnelle Messung innerhalb von Minuten in chromogenen Kanälen üblicher Gerinnungsautomaten (diese messen eine Trübung oft bei mehreren Wellenlängen zwecks Korrektur und weisen da-  
20 her in der Regel die Möglichkeit zur wellenlängenselektiven und wellenlängenvariablen Lichtabsorptionsmessung auf); hohe Reproduzierbarkeit der gefundenen Werte aufgrund einer sehr niedrigen Streuung der Einzelwerte (das Konfidenzintervall liegt gemäß einer  
25 Vielzahl von Versuchsserien unter 5%, in der Regel bei 2,2 - 3,5%); die hohe Genauigkeit bzw. Reproduzierbarkeit wird zudem auch bei sehr hohen Thrombininhibitor- bzw. Hirudinspiegeln erreicht; aufgrund der vorstehenden Eigenschaften eignet sich das erfindungs-  
30 gemäße Verfahren zur nationalen und internationalen Standardisierung.

Das erfindungsgemäße Verfahren findet Einsatz einerseits in der Wissenschaft, nämlich in allen Bereichen von Untersuchungen, in denen Thrombininhibitorkonzentrationen bestimmt werden müssen, sowie dem (ggf. high capacity) Screenen von prospektiven Thrombininhibitoren. In letzterem Fall kann mit hohem Durchsatz eine Vielzahl von synthetischen prospektiven Inhibitoren auf ihre tatsächliche Wirkung untersucht werden. Aktivität meint hierbei die Feststellung, ob überhaupt eine Inhibierung stattfindet und bejahendenfalls, wie die Kinetik bzw. spezifische Aktivität ist. Andererseits bietet sich auch der klinische Einsatz an, beispielsweise bei der Überwachung von Thrombininhibitorspiegeln bei Patienten, welchen der Inhibitor aus therapeutischen Gründen verabreicht wird. Auf einfache und kostengünstige Weise kann so vermieden werden, daß eine Unter- oder Überdosierung des Thrombininhibitors stattfindet, und zwar sowohl in quasi-kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Überwachung.

20

Im einzelnen kann das nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifende gerinnungshemmende Mittel ausgewählt sein aus der Gruppe "Calcium-Komplexbildner, Heparin, Heparinoide, Antithrombin III, Protein C, Fibrinpolymerisationshemmstoffe und Mischungen aus diesen Stoffen". Ein konkretes Beispiel hierfür ist Pefabloc FG der Firma Pentapharm AG, Basel, Schweiz, welches ein Tetrapeptid (Gly-Pro-Arg-Pro) ist und mit hoher Affinität die Fibrinogen-Polymerisation verhindert. Die Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltende Substanz kann ausgewählt sein aus der Gruppe der Schlangengifte und Schlangengiftfraktionen,

beispielsweise Gifte von Dispholidus, Rhabdophis, Bothrops, Notechis, Oxyuranus und Russel Viper. Zweckmäßigerweise werden gereinigte Fraktionen daraus verwendet. Vorzugsweise wird Ecarin, eine hochgradig  
5 gereinigte Fraktion des Echis-carinatus Toxins oder Multisquamase, das Prothrombin-spaltende Enzym aus Echis multisquamatus, verwendet. Solche Substanzen, wie beispielsweise Ecarin sind käuflich erwerbbar u.a. von der Firma Pentapharm AG, Schweiz.

10

Das durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbare chromogene Substrat kann unter Spaltung p-Nitroanilin freisetzen und die Lichtabsorptionsmessung kann dann bei 405 nm durchgeführt werden. Beispiele  
15 für solche oder auch andere Substrate sind Tripeptide, welche unter den Namen Chromozym TH oder Pefachrom TH von den Firmen Chromogenix, Boehringer, Pentapharm erhältlich sind (Pefachrome TH ist H-D-ChG-Ala-Arg-pN.2AcOH). Ein Beispiel für flouochrome Substrate ist  
20 Pefachrom TH flourogen, welches unter den Namen Pefa 15865 von der Firma Pentapharm erhältlich sind.

Im einzelnen empfiehlt es sich bei den in Frage kommenden Aktivitäten, in Stufe c) eine erste Absorp-  
25 tions- oder Emissionsmessung nach 0 - 100 s, vorzugsweise 0 - 50, höchstvorzugsweise 5 - 15 s, und eine zweite nach anschließenden 10 - 1000 s, vorzugsweise 50 - 500 s, höchstvorzugsweise 150 - 300 s, gezählt ab Zugabe der Prothrombin in Meizothrombin  
30 bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz oder des Meizothrombins bzw. MTdesfgl, durchzuführen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere zur Bestimmung vom Hirudin oder der Bestimmung der Konzentration und/oder

der Aktivität von synthetischen Thrombininhibitoren oder Hirulogen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Test Kit zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit mit folgenden Kitkomponenten: K1) einer Lösung eines nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifenden gerinnungshemmenden Mittel, K2) einem durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbaren chromogenen oder flourogenen Substrat und K3) einer Lösung einer Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz, wobei die Komponente K3) ersetzt oder ergänzt sein kann durch eine Komponente K3a) einer Lösung mit Meizothrombin bzw. Mtdesfgl, sowie ein Test Kit zur Bestimmung der Aktivität von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit oder einer nicht-trüben natürlichen wässrigen Flüssigkeit mit folgenden Kitkomponenten: optional K1) einer Lösung eines nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifenden gerinnungshemmenden Mittel, K2) einem durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbaren chromogenen oder flourogenen Substrat und K3) einer Lösung einer Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz, wobei die Komponente K3) ersetzt oder ergänzt sein kann durch eine Komponente K3a) einer Lösung mit Meizothrombin bzw. Mtdesfgl. Die Kitkomponenten können voneinander getrennt aber in einer einzigen Testkitpackung vorgesehen sein. Es kann

als optional einsetzbare zusätzliche Kitkomponente eine Lösung mit Prothrombin vorgesehen ist.

In jedem Fall versteht sich, daß bei Zugabe von Thrombin, Meizothrombin bzw. Mtdesfgl und/oder Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanzen diese in definierten, vorgegebenen Mengen eingesetzt werden. Entsprechendes gilt für Substrat.

- 10 Aufgrund des für Screeningzwecke besonders geeigneten erfindungsgemäßen Verfahrens sind auch Gegenstand der Erfindung damit gefundene bzw. charakterisierten neue Thrombininhibitoren, welche nämlich erhältlich sind durch folgende Verfahrensschritte: A) Elemente einer
- 15 Gruppe von prospektiven Thrombininhibitoren werden in vorgegebener und vorzugsweise gleicher Konzentration subsequent oder getrennt simultan einem Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8 unterworfen, B) die Verminderung der Lichtabsorption oder Lichtemission je
- 20 Zeiteinheit wird für jeden prospektiven Thrombininhibitor ermittelt und mit der unter gleichen Bedingungen bestimmten Lichtabsorption oder Lichtemission je Zeiteinheit einer vorgegebenen, vorzugsweise gleichen Konzentration von Hirudin verglichen, C) es werden
- 25 diejenigen prospektiven Thrombininhibitoren ausgewählt, deren Verminderung der Lichtabsorption oder Emission je Zeiteinheit mindestens 10% der entsprechenden Abnahme bei Einsatz von Hirudin entspricht.

30

Für das erfindungsgemäße Test Kit sowie die erfindungsgemäß aufgefundenen Thrombininhibitoren gelten

die zum erfindungsgemäßen Verfahren getroffenen Detaillierungen entsprechend.

Sofern Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingesetzt wird, so  
5 kann dies käuflich erworben werden, beispielsweise von der Fa. Pentapharm AG, Schweiz, aber auch beispielsweise gemäß der Vorschrift in der Literaturstelle US-A-5,547,850 hergestellt werden an immobilisiertem Ecarin.

10

Bei den im Rahmen der Erfindung einsetzbaren Geräten handelt es beispielsweise um meist ohnehin vorhandene halb- oder vollautomatische Gerinnungsgeräte. In Frage kommen dabei z.B. Gerinnungsautomaten des Typs Sysmex  
15 CA-500 oder S2000 der Firma Dade-Behring oder des Typs Electra 2000. Beim CA-500 wird das von einer LED emittierte Licht durch einen Filter (405nm) gesandt und anschließend durch die Probe. Das CA-500 bestimmt im chromogenen Kanal die Änderung bzw. Verminderung der  
20 Lichtabsorption von Farbstoffen, wie z.B. pNA (p-Nitroanilin). Ist in einer Probe beispielsweise Hirudin, so wird das generierte oder zugegebene Meizothrombin bzw. Mtdesfgl inaktiviert mit der Folge einer dadurch behinderten pNA-Freisetzung. Die in-  
25 sofern sich anders verhaltende (ändernde) optische Dichte der Probe wird mittels einer Photodiode aufgenommen und ausgewertet. Die zu beobachtende Lichtabsorptionsänderung ist umgekehrt proportional der Hirudinaktivität.

30

Im folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsbeispiele darstellenden Experimenten näher erläutert.

Zur Bestimmung einer Standardkurve wurde gepooltes Humancitratplasma mit vorgegebenen Mengen Hirudinlösung versetzt. Die so erhaltenen Standardlösungen 5 wurden in einem CA-500 gemessen.

Als Reagenzien wurden eingefüllt,

Reagent 1 [Inhib] (Raumtemperatur): 400µl Pefabloc FG  
10 (20 mM; gelöst in 0,9% NaCl) + 2100 µl Tris-Puffer,

Reagent 2 [Chromo] (Raumtemperatur): Pefachrome TH  
(10µmol/vial), verdünnt auf 3µmol/ml Aq. dest,

15 Reagent 3 [Ecarin] (15°C): Ecarin (50 EU/vial),  
verdünnt auf 0,3 EU/ml (der Inhalt des Ecarinfläschchen wird in 5ml 0,9% NaCl-Lösung gelöst und kurz vor dem Einsatz mit einer 1:2 Mischung aus 0,9% NaCl, enthaltend 1% Prionex (Merck), und 0,1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung auf  
20 die Endkonzentration eingestellt.

Das Testprotokoll ist folgend wiedergegeben. Als Dil. Buffer wurde eingesetzt eine Mischung aus 16,6µl Prothrombin (gereinigt; Proteingehalt: 2,22 mg/ml) und  
25 984 µl einer Mischung aus 900µl Tris-Puffer (0,05 M, pH 8, 37°C, + 0,1M NaCl) und 100µl Prionex (Merck).



5

Testprotokoll:

Name

Ecch

Detector	Chrom
Start Point	5 sec
End Point	180 sec
Sensitivity	Low Gain
1 SampleVol.	Zitratplasma 5 µl
Dil. Vol.	Buffer 70 µl
2 SampleVol.	0 µl
*****	0 µl
Reagent 1	30 sec
Reag. Vol. .	Inhib 125 µl
Rinse	125 µl
Reagent 2	120 sec
Chromo	Chromo 20 µl
Rinse	100 µl
Reagent 3	210 sec
Reag. Vol.	Ecarin 20 µl
Rinse	50 µl

10

15

(Rinse: 1%ige Natrium-Hypochloritlösung)

20 In der Fig. 1 ist die erhaltene Standardkurve wieder-  
 gegeben. Es fällt der extrem gute Korrelationskoef-  
 fizient von 0,9977 auf. Im Experiment wird lediglich  
 die Standardprobe durch eine zu bestimmende Probe er-  
 setzt und die unbekannte Hirudinkonzentration in der  
 25 Figur 1 anhand der gemessenen Abnahme der optischen  
 Dichte abgelesen.

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von  
Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körper-  
5 flüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus  
einer Körperflüssigkeit mit den folgenden  
Verfahrensschritten:
  - 10 a) einem Lebewesen wird die Körperflüssigkeit ent-  
nommen und die Körperflüssigkeit wird erforder-  
lichenfalls einer Abtrennung von Trübstoffen  
unterworfen,
  - 15 b) der in Stufe a) erhaltenen nicht-trüben Körper-  
flüssigkeit werden ein nicht in die Umwandlung  
Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl  
eingreifendes gerinnungshemmendes Mittel, ein  
durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl  
20 spaltbares chromogenes oder flourogenes Sub-  
strat und eine Prothrombin in Meizothrombin  
bzw. Mtdesfgl spaltende Substanz oder Mei-  
zothrombin bzw. Mtdesfgl zugegeben, sowie, op-  
tional, Prothrombin,
  - 25 c) die in Stufe b) erhaltene Lösung bzw. Mischung  
wird einer wellenlängenselektiven Lichtabsorp-  
tions- oder Lichtemissionsmessung in Abhängig-  
keit von der Zeit unterworfen,
  - 30 d) aus der Verminderung der Lichtabsorption oder  
Lichtemission in Stufe c) je Zeiteinheit wird  
die in der Körperflüssigkeit enthaltene Menge

des Thrombininhibitors durch Vergleich mit ermittelten Standardkurven bestimmt.

2. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben wäßrigen Flüssigkeit mit den folgenden Verfahrensschritten:

a) einem Lebewesen wird eine Körperflüssigkeit entnommen und die Körperflüssigkeit wird erforderlichenfalls einer Abtrennung von Trübstoffen unterworfen oder eine nicht-trübe Flüssigkeit wird künstlich hergestellt,

b) der in Stufe a) erhaltenen nicht-trüben Flüssigkeit werden eine vorgegebene Menge an Thrombininhibitor, ggf. ein nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifendes gerinnungshemmendes Mittel, ein durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbares chromogenes oder flourogenes Substrat und eine Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltende Substanz oder Meizothrombin bzw. Mtdesfgl zugegeben, sowie, optional, Prothrombin,

c) die in Stufe b) erhaltene Lösung bzw. Mischung wird einer wellenlängenselektiven Lichtabsorptions- oder Lichtemissionsmessung in Abhängigkeit von der Zeit unterworfen,

d) aus der Verminderung der Lichtabsorption oder -Lichtemission in Stufe c) je Zeiteinheit wird die Aktivität des Thrombininhibitors durch

Vergleich mit ermittelten Standardkurven bestimmt.

- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das nicht  
in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin  
bzw. Mtdesfgl eingreifende gerinnungshemmende Mit-  
tel ausgewählt ist aus der Gruppe "Calcium-  
Komplexbildner, Heparin, Heparinoide, Antithrombin  
10 III, Protein C, Fibrinpolymerisationshemmstoffe und  
Mischungen aus diesen Stoffen".
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei  
15 die Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl  
spaltende Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe  
der Schlangengifte und Schlangengiftfraktionen.
- 20 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei  
die Prothrombin in Meizothrombin Bzw. Mtdesfgl  
spaltende Substanz Ecarin ist.
- 25 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei  
das durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl  
spaltbare chromogene Substrat unter Spaltung p-  
Nitroanilin freisetzt und die Lichtabsorptionsmes-  
sung bei 405 nm durchgeführt wird.  
30
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei  
in Stufe c) eine erste Absorptions- oder

- Emissionsmessung nach 0 - 100 s, vorzugsweise 0 - 50, höchstvorzugsweise 5 - 15 s, und eine zweite nach anschließenden 10 - 1000 s, vorzugsweise 50 - 500 s, höchstvorzugsweise 150 - 300 s, gezählt ab
- 5 Zugabe der Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz oder des Meizothrombins bzw. Mtdesfgl, durchgeführt werden.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Thrombininhibitor Hirudin, ein Hirolog oder ein synthetischer Thrombininhibitor ist.
- 15 9. Test Kit zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit mit folgenden Kitkomponenten: K1) einer Lösung eines nicht in die Umwandlung
- 20 Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifenden gerinnungshemmenden Mittel, K2) einem durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbaren chromogenen oder flourogenen Substrat und K3) einer Lösung einer Prothrombin in Meizothrombin
- 25 bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz, wobei die Komponente K3) ersetzt oder ergänzt sein kann durch eine Komponente K3a) einer Lösung mit Meizothrombin bzw. Mtdesfgl.
- 30 10. Test Kit zur Bestimmung der Aktivität von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit oder einer nicht-trüben nicht

natürlichen wäßrigen Flüssigkeit mit folgenden  
Kitkomponenten: optional K1) einer Lösung eines  
nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Mei-  
zothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifenden gerinnung-  
5 shemmenden Mittel, K2) einem durch aktives  
Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbaren chromogenen  
oder flourogenen Substrat und K3) einer Lösung  
einer Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl  
spaltenden Substanz, wobei die Komponente K3) er-  
10 setzt oder ergänzt sein kann durch eine Komponente  
K3a) einer Lösung mit Meizothrombin bzw. Mtdesfgl.

11. Test Kit nach Anspruch 9 oder 10, wobei die  
15 Kitkomponenten voneinander getrennt aber in einer  
einzigen Testkitpackung vorgesehen sind.

12. Test Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei  
20 als optional einsetzbare zusätzliche Kitkomponente  
eine Lösung mit Prothrombin vorgesehen ist.

13. Thrombininhibitoren, welche erhältlich sind durch  
25 folgende Verfahrensschritte:

A) Elemente einer Gruppe von prospektiven Throm-  
bininhibotoren werden in vorgebener und vor-  
zugsweise gleicher Konzentration subsequent  
30 - oder getrennt simultan einem Verfahren nach  
einem der Ansprüche 2 bis 8 unterworfen,

- 5 B) Die Verminderung der Lichtabsorption oder Lichtemission je Zeiteinheit wird für jeden prospektiven Thrombininhibitor ermittelt und mit der unter gleichen Bedingungen bestimmten Lichtabsorption oder Lichtemission je Zeiteinheit einer vorzugsweise gleichen Konzentration von Hirudin verglichen,
- 10 C) es werden diejenigen prospektiven Thrombininhibitoren ausgewählt, deren Abnahme der Lichtabsorption oder Emission je Zeiteinheit mindestens 10% der entsprechenden Abnahme bei Einsatz von Hirudin entspricht.

15

20

25

30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



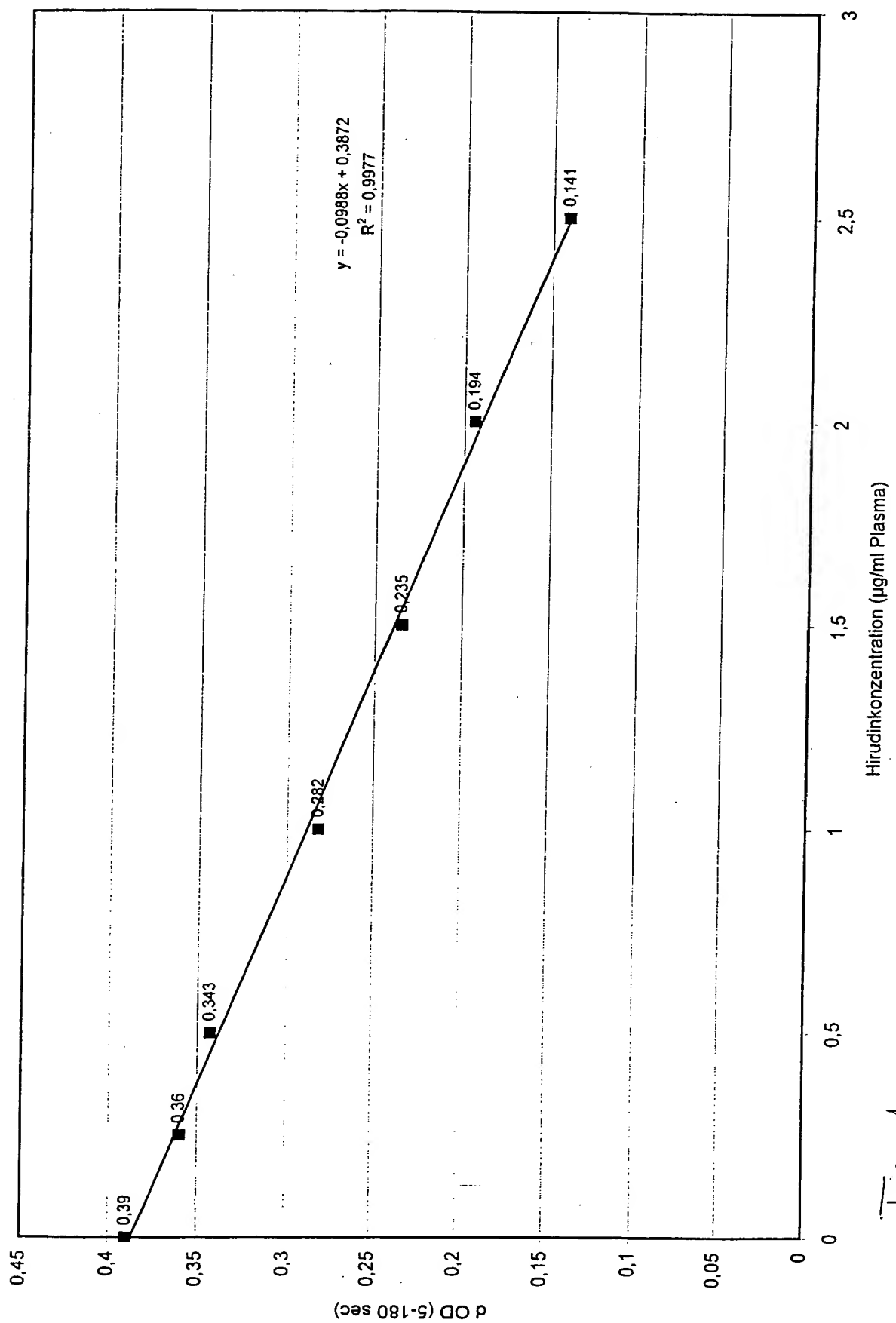


Fig. 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**